

Afdeling Diergeneesmiddelen 1983-03-25
VERSLAG 83.32 Pr.nr. 404.0600

Onderwerp: Bepaling van residuen sulfadimidine in vlees, nieren, levers etc. van kippen.

Bijlagen: 5.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofd (2x), afdeling Diergeneesmiddelen (4x), afdeling Normalisatie (Humme), projektbeheer, projekteider.

Afdeling Diergeneesmiddelen.

Datum: 1983-03-25.

VERSLAG 83.32

Pr.nr. 404.0600

Projekt: Onderzoek naar het voorkomen, gehalte en stapeling van
diverse diergeneesmiddelen in landbouw- en visserijprodukten.

Onderwerp: Bepaling van residuen sulfadimidine in vlees, nieren,
levers etc van kippen.

Bijlagen: 5.

Doel:

In samenwerking met de Gezondheidsdienst voor Pluimvee te Doorn en het RIKILT te Wageningen is een experiment opgezet om na te gaan of na behandeling van slachtkuikens met sulfadimidine, residuen van sulfadimidine kunnen worden teruggevonden met behulp van beschikbare analysemethoden.

Samenvatting:

Er werden monsters bloed, serum, lever, nier en vlees onderzocht op sulfadimidine residuen met behulp van RIKILT interne analysevoorschriften waarbij HPLC met UV-detektie als analysetechniek diende.

Conclusie:

Na stopzetting van de therapie is nog na enige dagen sulfadimidine in bloed, serum, lever, nier en vlees aantoonbaar.

De analysemethoden voldeden, na aanpassing, goed.

Verantwoordelijk: drs F.G. Bulzer

Samenstellers: W.M.J. Beek, ^{W.B.} mw Y.J.M. van Hemert-de Boer,

H.A. Roozendaal en mw M.A. Visser-Meijer

Projektleider: G.D. van Bruchem

Inleiding

Om na te kunnen gaan of residuen van sulfadimidine nog aantoonbaar zijn nadat slachtkuikens met dit geneesmiddel zijn behandeld is in samenwerking met de Gezondheidsdienst voor Pluimvee en het RIKILT hiervoor een proef opgezet.

Hierbij werden 20 slachtkuikens gedurende 3 dagen behandeld met sulfadimidine. Daarnaast kregen 20 andere slachtkuikens geen sulfadimidine toegediend. Na deze therapie werden iedere dag 2 stuks behandelde en 2 stuks onbehandelde kuikens geslacht.

De verzamelde organen, vlees etc. werden geanalyseerd op sulfadimidine residuen zodat een uitspraak gedaan kon worden over:

- hoelang residuen van sulfadimidine nog aantoonbaar zijn nadat slachtkuikens hiermee behandeld zijn, in verband met eventuele vaststelling van wachttijden
- het testen van analysemethodieken ontwikkeld door het RIKILT.

Proefopzet (Gezondheidsdienst voor Pluimvee)

Twee aparte groepen van 20 ééndaagse slachtkuikens werden opgefokt tot de leeftijd van 32 dagen.

Gedurende deze opfokperiode kregen deze kuikens voeder zonder coccidiostaticum of geneesmiddel verstrekt. Na deze periode werd één van de groepen sulfadimidine-natrium verstrekt via het drinkwater gedurende 3 etmalen. De andere groep kreeg geen sulfadimidine (controlegroep). De dosering in het water bedroeg 2 gram per liter. Na deze behandeling werd diermateriaal verzameld vanaf de eerste dag na behandeling door dagelijks 2 dieren te doden. Van de controlegroep, welke niet behandeld was, zijn ook 2 dieren iedere keer geslacht en materiaal verzameld.

De medicatie verliep van vrijdag 8.30 uur tot maandag 8.30 uur. Op maandag, de eerste dag na de behandeling, werd geslacht en verzameld. Dit was dag één. Op dag één, twee, drie, vier, vijf, acht en elf werden telkens om 8.30 uur twee dieren van elke groep geslacht. Per dier werd verzameld: heparine bloed, serum, lever, nier en borst-vlees.

Een deel ervan werd geanalyseerd door de GVP (Gezondheidsdienst voor Pluimvee) en het andere deel werd onderzocht door het RIKILT (Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten).

Bloed en serum werden bewaard bij 4°C. Levers, nieren en vlees door invriezen bij -18°C (bijlage 1, projektbeschrijving).

Analyse

De monsters bloed en serum werden onderzocht met behulp van voorlopig intern analysevoorschrift nr. Dgm 19 (bijlage 2):

- Bepaling van sulfadimidine in bloed en plasma door middel van HPLC; met de navolgende werkwijze:

Sulfadimidine wordt uit het bloed geëxtraheerd met ethylacetaat in aanwezigheid van fenylbutazon. De ethylacetaatfase wordt ingedampt tot droog en het residu wordt opgenomen in een waterige fase.

Hierna volgt analyse met behulp van isocratische reversed phase HPLC.

De monsters nier, lever en vlees werden onderzocht met behulp van voorlopig intern analysevoorschrift nr. Dgm 29 (bijlage 3):

- Bepaling van sulfadimidine in vlees met behulp van vloeistofchromatografie (HPLC-methode); met de navolgende werkwijze:

Sulfadimidine wordt uit het vlees geëxtraheerd met behulp van een chloroform/acetonmengsel.

Het extract wordt gezuiverd door vloeistofextractie.

De uiteindelijk verkregen zure oplossing wordt op pH 5,60 gebracht waarna een vloeistof-vloeistof extractie met dichloormethaan volgt waarbij de sulfadimidine in de dichloormethaanfase overgaat.

Na verdampen van de dichloormethaanfase wordt het residu opgenomen in eluens. Het gehalte sulfadimidine wordt bepaald met behulp van isocratische "reversed phase" hogedruk vloeistofchromatografie met UV-detektie bij 254 nm.

Bespreking

Bij de analyse van bloed/serum bleek dat de monsters klonterig waren en daardoor niet erg homogeen. Toen de bloed/serum monsters (bewaard in koelkast) na enige weken (2) nogmaald geanalyseerd werden, bleek het aantal matrixpieken sterk toegenomen te zijn. Het verdient dus aanbeveling het bloed en serum zo snel mogelijk te analyseren.

De levers en nieren bleken van een dusdanige grootte te zijn dat hierdoor een zeer lage inweeg van monstermateriaal maar mogelijk was en de nauwkeurigheid daardoor te wensen overliet.

Bij de analyse van kippevlees, levers en nieren bleek de zuivering/opwerking niet geheel te voldoen. Mede hierdoor waren ook de resultaten van de recoveryproeven zeer wisselend. Een extra zuiveringsstap werd daarom toegepast.

Het zo geoptimaliseerde analysevoorschrift is weergegeven in bijlage 4. Toch bleef bij levers en vooral de nieren het probleem bestaan dat het materiaal, bij chloroform/acetonextraktie, aan de wand van het beker-glas ging plakken en hierdoor mogelijk sulfadimidine ingesloten werd. De controlegroep bleek ook positieve waarden te geven met de genoemde analysemethodieken. Dit zou kunnen wijzen op mogelijke besmetting van het materiaal, misschien via glaswerk of werkruimte. De resultaten staan vermeld in bijlage 5.

Conclusie

Na stopzetting van de therapie is nog na enige dagen sulfadimidine in bloed, serum, lever, nier en vlees aantoonbaar.

De analysemethodieken voldeden, na aanpassing, goed.

PROJECTBESCHRIJVING

Bijlage 1.

Onderzoekinstelling: Gezondheidsdienst voor Pluimvee. (G.V.P.).

Projektnummer :

Projecttitel : Onderzoek naar residuën van sulfadimidine in
slachtkuikens.

Onderzoeker(s) : M. Vertommen.

Projectleider :

Samenwerking : Rijks Kwaliteitsinstituut voor Land- en Tuinbouwprodukten
-incidentele kontakten met: (RIKILT).

-veelvuldig overleg met : Drs. F. G. Buizer en Dhr. van Bruchem.

Plaats van uitvoering: G.V.P. hok 3 afdeling 7.

Datum van aanvang : 22 september 1982.

Vermoedelijke duur : 6 weken.

Vervolg op vroeger onderzoek (proj.nr.):

Geraamde direkte kosten f

Geraamde tijd van direkt bij het projekt betrokken personeel:

- | | |
|------------------------|----------|
| - Hoger personeel | mandagen |
| - Middelbaar personeel | mandagen |
| - Lager personeel | mandagen |

Bijzondere aanschaffingen of voorzieningen (omschrijving en bedragen):

40 ééndags slachtkuikens

mestmeel zonder coccidiostaticum voor 6 weken.

Overige opmerkingen t.a.v. de kosten:

Titelvertalingen:

- | | |
|----------|---|
| - Engels | : |
| - Frans | : |
| - Duits | : |

Algemene opmerkingen:

Projekt no.

Beknopte beschrijving van achtereenvolgens:

- A. Probleem en doel
- B. Motivering (ekonomisch of wetenschappelijk perspectief)
- C. Werkwijze (methodiek en hulpmiddelen)
- D. Vroegere onderzoeken.

A. Probleem en doel:

Dit experiment is het eerste in een reeks waarbij nagegaan zal worden of na behandeling van slachtkuikens met "Geneesmiddelen" residuen hiervan teruggevonden kunnen worden na extractie uit bloed en/of organen.

Voor sulfadimidine zal gebruik gemaakt worden van een analyse methodiek die bij het RIKILT ontwikkeld werd.

B. Motivering: Bekend.

C. Werkwijze:

Opgezet worden twee groepen van 20 ééndags slachtkuikens.

Een groep dient als controle groep.

De dieren worden op kooi gehuisvest en opgefokt tot de leeftijd van 32 dagen. Gedurende de opfok periode krijgen de kuikens voer waarin géén coccidiostaticum of . . . geneesmiddel verwerkt is.

Op 32 dagen leeftijd wordt aan één der beide groepen sulfadimidine-Natrium door het drinkwater verstrekt.

De dosering zal zijn 2 gram per liter drinkwater.

De behandelings duur 3 dagen. Vanaf één dag na de behandeling worden dagelijks 2 dieren van de proefgroep gedood en materiaal verzameld voor analyse.

Per dier wordt verzameld: heparine bloed, bloed plasma en bloed serum.

Lever, nier en borstvlies.

Lever, nier en borstvlies worden ingevroren.

Alle monsters worden in twee gelijke delen gesplitst.

Eén deel wordt naar het RIKILT vervoerd voor analyse het andere deel wordt op het lab. van de GVP geanalyseerd.

Datum lijstje:

opzet datum : 22 september 1982.

data geneesmiddel behandeling: 22; 23 en 24 oktober 1982.

sektie data : vanaf 25 oktober 1982 en achtereenvolgens zolang noodzakelijk.

Voorlopig Intern Analysevoorschrift nr. Dgm 19
1e oplage (1982-10-25)

BEPALING VAN SULFADIMIDINE IN BLOED EN PLASMA DOOR MIDDEL VAN HPLC

Verzendlijst: afd. Harmonisatie/Normalisatie, bibliotheek (5x), afd.
Diergeneesmiddelen (7x), afd. Microbiologie, cir-
culatiemap PVS 8

Bepaling van sulfadimidine in bloed en plasma door middel van HPLC

1. Doel en toepassingsgebied.

Met de methode kunnen residuen van sulfadimidine in bloed worden bepaald. De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt 0,5 µg/ml of µg/g.

Het terugvindingspercentage bedraagt meer dan 95%.

Het niveau ligt tussen 1-20 µg/ml of µg/g.

2. Principe.

Sulfadimidine wordt uit het bloed geextraheerd met ethylacetaat in aanwezigheid van fenylbutazon. De ethylacetaatfase wordt ingedampt tot droog en het residu wordt opgenomen in een waterige fase.

Hierna volgt een analyse met behulp van isocratische reversed phase HPLC.

3. Reagentia.

Alle reagentia dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn of van een hogere kwaliteit indien vermeld.

3.1 Millipore water

3.2 Methanol, lichrosolv kwaliteit (b.v. Merck art. 6007)

3.3 Ammonia gec. (b.v. BDH 10011)

3.4 Ethylacetaat, Uvasol kwaliteit (b.v. Merck art. 863)

3.5 IJsazijn (b.v. Merck art. 10001)

3.6 Fenylbutazon (b.v. Serva art. 32325)

3.7 Acetonitril (b.v. Merck art. 3)

3.8 Sulfadimidine standaardstof

3.9 HPLC eluens.

Meng 800 ml millipore water (3.1) met 200 ml methanol (3.2) en 10 ml ijsazijn (3.5) en filtreer het geheel door een millipore filter (0,45 μm)

3.10 Oplosmiddel sulfadimidine.

Meng 70 ml millipore water (3.1) met 30 ml acetonitril (3.7) en 5 ml ammonia (3.3).

3.11 Standaard stamoplossing (oplossing A)

Weeg 50 mg sulfadimidine (3.8) op 0,1 mg nauwkeurig af in een 100 ml maatkolf. Los op in methanol (3.2), vul aan en meng.

3.11.1 Standaardoplossingen.

Pipetteer 20,0 ml standaardstamoplossing in een maatkolf van 100 ml en vul aan met HPLC eluens (3.9) en meng (oplossing B). Pipetteer van deze oplossing 10,0 ml in een maatkolf van 100 ml en vul aan met HPLC eluens (3.9) en meng (oplossing C). Pipetteer 40,0, 20,0 en 10,0 ml van deze oplossing in afzonderlijke maatkolven van 100 ml, vul aan en meng (oplossingen D, E en F). De concentraties van deze oplossingen zijn:

B = 100 $\mu\text{g/ml}$, C = 10 $\mu\text{g/ml}$, D = 4 $\mu\text{g/ml}$, E = 2 $\mu\text{g/ml}$, F = 1 $\mu\text{g/ml}$.

4. Apparatuur.

4.1 Hogedrukvlloeistofchromatografische apparatuur met UV-detector en als kolom μ Bondapak C_{18} 10 micron (3,9 mm I.D. x 300 mm lengte) Waters art. 27324.

4.2 Vibro-fix.

4.3 Waterbad (indamp).

4.4 Koelcentrifuge.

4.5 Normaal laboratorium glaswerk.

5. Werkwijze.

Voeg bij 0,5 ml of 0,5 g nauwkeurig afgepipetteerd of ingewogen bloed of plasma welke zich in een centrifugebuis met ingeslepen stop van 25 ml bevindt, ongeveer 20 mg fenylbutazon.

Meng het enkele seconden op een vibro-fix. Pipetteer hierbij 10,0 ml ethylacetaat (3.4) en sluit de buis af. Schud het geheel gedurende 1 minuut intensief en scheid de fasen door middel van 5 minuten centrifugeren in een koelcentrifuge bij 10°C. Pipetteer 5,0 ml van de bovenstaande ethylacetaatfase in een 10 ml cultuurbuis met schroefdop en damp het geheel in met stikstof op een waterbad bij 35°C. Voeg nadat het geheel is ingedampt tot droog nauwkeurig 0,5 ml oplosmiddel (3.10) toe en los op met behulp van een vibro-fix. Filtreer de oplossing door een millipore filter (0,2 µm).

6. Hogedrukvlloeistofchromatografie.

Eluens: water-methanol-ijsazijn 80-20-1

Injectievolumen: 50 µl

Eluenssnelheid: 2,0 ml/min

Golflengte: UV-254.nm

Gevoeligheid: min 0,01 A

Recordersnelheid: 10 mm/min.

7. Uitvoering.

Breng 50 µl van de verkregen monsteroplossing in het HPLC systeem en vergelijk de sulfadimidinepiek met die, die met een van de standaardoplossingen (3.11.1) wordt verkregen.

Bereken het gehalte in µg/ml of µg/g aan sulfadimidine in het monster.

8. Opmerkingen.

8.1 Alle chemicaliën dienen te worden gecontroleerd op bruikbaarheid.

8.2 Bij analyse van bloed en plasma dient een "blanco" monster geanalyseerd te worden ter vergelijking van eventuele storingen.

8.3 Voor de analyse van het terugvindingspercentage dient men bij blanco bloed of plasma een zodanige hoeveelheid van de standaardoplossingen toe te voegen dat een gehalte tussen de 0,2 en 20 µg/ml of µg/g wordt verkregen (verdunde standaard in methanol indampen tot droog en blanco bloed toevoegen).

8.4 Na een etmaal analyses op de kolom dient deze gespoeld te worden met 50% methanol voor elutie van de geabsorbeerde stoffen.

9. Literatuur.

9.1 Determination of sulfonamides in Swine Plasma.

R.F. Bevill, K.M. Schermske, H.G. Luther etc.

J. Agric. Food Chem. vol. 26, no. 5, 1978, pp 1201-1203.

9.2 Determination of Sulfa Drugs in Biological Fluids by Liquid Chromatography (Massaspectrometry) Mass. Spectrometry.

J.D. Henlon, B.A. Thomson, P.H. Dawson,


Anal. Chem. 1982, 54. 451-456.

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer

Samenstellers : G.D. van Bruchem en W.M.J. Beek

VOORLOPIG INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. DGM 29
1e oplage (1982-11-30)

BEPALING VAN SULFADIMIDINE IN VLEES MET BEHULP VAN VLOEISTOFCHROMATO-
GRAFIE (HPLC-METHODE)

Verzendlijst: Bibliotheek (5x), sektorhoofd, afdeling Normalisatie/
harmonisatie, afdeling Diergeneesmiddelen (6x), circu-
latiemap, afd. Microbiologie. 

Bepaling van sulfadimidine in vlees met behulp van vloeistofchromatografie (HPLC-methode)

1. Doel en toepassingsgebied

Met de methode kunnen residuen van vrij sulfadimidine in vlees worden bepaald. De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt ca. 10 ppb. Het terugvindingspercentage ligt bij 75%. Het toepassingsniveau van de methode ligt tussen 20 ppb - 1 ppm.

2. Principe

Sulfadimidine wordt uit het vlees geëxtraheerd met behulp van een chloroform/aceton mengsel. Het extrakt wordt gezuiverd door vloeistof-vloeistof extractie. Aansluitend wordt een zure oplossing op pH 5,60 gebracht waarna een vloeistof-vloeistof extractie met dichloormethaan volgt waarbij de sulfadimidine in de dichloormethaanfase overgaat. Na verdampen van de dichloormethaanfase wordt sulfadimidine in het residu bepaald met behulp van isocratische "reversed phase" hogedruk-vloeistofchromatografie met UV-detektie bij 254 nm.

3. Reagentia

Alle reagentia dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn of van een hogere kwaliteit indien vermeld.

3.1 Aceton (b.v. Merck art. 14).

3.2 Chloroform (b.v. Merck art. 2445).

3.3 Dichloormethaan (b.v. Merck art. 6050).

3.4 Acetonitril (Lichrosolv kwaliteit, Merck art. 30).

3.5 Hexaan (b.v. Merck art. 4367).

3.6 Zoutzuur, gec. (b.v. Merck art 317).

3.7 Water, gedemineraliseerd.

3.8 Zoutzout 1 N.

Breng 8 ml zoutzuur (3.6) in water (3.7) en vul aan tot 100 ml.

3.9 Trinatriumcitraat 2 aq (b.v. Merck art. 6448).

3.10 Verzadigde trinatriumcitraatoplossing.

Meng meer dan 72 g trinatriumcitraat 2 aq (3.9) in 100 ml water (3.7).

3.11 Natriumhydroxyde (b.v. Merck art. 6498).

3.12 Natriumhydroxyde-oplossing 6 N.

Los 24 g natriumhydroxyde (3.11) op in 100 ml water (3.7).

3.13 Kaliumdiwaterstoffsfaat (b.v Merck art. 4873).

3.14 Kaliummonowaterstoffsfaat (b.v. Merck 5104).

3.15 Natriumsulfaat, watervrij (b.v. Merck art. 6649).

3.16 Stikstof, zuiver.

3.17 Millipore water.

3.18 Extraktiemiddel: meng gelijke volumedelen chloroform (3.2) en aceton (3.1).

3.19 Glasvezelfilter GFA ϕ 15 cm (Whatman).

3.20 Milliporefilters (0,45 μ m) Acrodise 4184.

3.21 Ammonia (b.v. BDH art. 10011).

3.22 Oplosmiddel.

Meng 80 ml water (3.17) met 15 ml acetonitril (3.4) en 5 ml ammonia (3.21).

3.23 HPLC eluens sulfadimidine.

12% oplossing van acetonitril (3.4) in bufferoplossing pH 7,7.

Los 6,89 g kaliumdiwaterstoffsfaat (3.13) en 8,79 kaliummonowaterstoffsfaat (3.14) op in 1 l millipore water (3.17) en breng de pH met natriumhydroxyde-oplossing (3.12) op pH 7,70; gebruik een pH meter.

Voeg toe 136,4 ml acetonitril (3.4) en meng het geheel.

3.24 Sulfadimidine standaardstof.

3.24.1 Sulfadimidine stamoplossing (oplossing A).

Weeg op 0,1 mg nauwkeurig ca 50 mg standaardstof (3.2.4) af in een 100 ml maatkolf.

Los op met acetonitril (3.4) vul aan en meng.

3.24.2 Breng met een pipet 20,0 ml van de standaardoplossing in een 100 ml maatkolf en vul aan met oplosmiddel (3.22) en meng (oplossing B). Breng van deze oplossing met een pipet 10,0 ml in een 100 ml maatkolf en vul aan met oplosmiddel en meng (oplossing C).

Breng respectievelijk met een pipet, 20,0 ml; 10,0 en 5,0 ml in afzonderlijke maatkolven van 50 ml, vul aan met oplosmiddel en meng (oplossing D, E en F). De concentraties van de verkregen oplossingen zijn:

B 100 µg/ml, C 10 µg/ml, D 4 µg/ml

E 2 µg/ml, F 1 µg/ml.

4. Apparatuur

4.1 Vleesmolen (b.v. Moulinette).

4.2 Sorvall Omni mixer met vrijstaande rotoras en 1 inch mes.

4.3 Rotatieverdampeer (bad temp. 30°-40°C).

4.4 Hogedrukvlloeistofchromatografische apparatuur bestaande uit:
pomp, injector, UV-detektor, recorder.

4.5 HPLC-kolommen.

voorkolom : Bondapak C18/Corasil 37-50 micron

3,9 mm I.D. x 20 mm lengte

Waters art. 27248.

hoofdkolom: μ Bondapak C18 10 micron

3,9 mm I.D. x 30 cm lengte

Waters art 27324

of

Lichrosorb RP18 5 micron

4.6 mm I.D. x 15 cm lengte.

4.6 Digitale pH meter.

4.7 Normaal laboratoriumglaswerk.

5. Werkwijze

5.1 Extraktie.

Maal het vlees in een vleesmolen fijn. Weeg 25,0 g monster af in een bekeerglas van 400 ml (50,0 g indien het monster minder dan 0,1 mg/kg aan sulfadimidine bevat).

Breng nu met een maatcilinder 100 ml extraktiemiddel (3.18) in het bekeerglas en macereer gedurende 1 minuut bij lage snelheid met een Omni-mixer en 2 minuten bij hogere snelheid. Spoel de Omni-mixer af met ca. 10 ml extraktiemiddel en filtreer de oplosmiddelfase nu voorzichtig over een glasvezelfilter (3.19) in een indampkolf van 500 ml zodanig dat het vlees achterblijft in het bekeerglas.

Voeg hierna met een maatcilinder 50 ml extraktiemiddel in het bekeerglas en extraheer als bovenstaand.

Herhaal nadat ook deze extraktiefase is gefiltreerd het nogmaals met 50 ml extraktiemiddel en breng dan de inhoud van het bekeerglas nu geheel op het filter.

Spoel het filter etc. na met 25 ml extraktiemiddel.

Voeg nu aan de verzamelde extraktoplossing 10,0 ml zoutzuur 1 N (3.8) en damp de organische fase af op een rotatieverdamer totdat alle organische oplosmiddelen zijn verdwenen.

5.2 Zuivering.

Breng het waterig residu met 75 ml hexaan (3.5) in een scheitrechter van 250 ml.

Breng 10,0 ml zoutzuur 1 N (3.8) in de indampkolf en zwenk de kolf enige malen en breng dit in de scheitrechter met 75 ml hexaan.

Spoel het resterende residu nu met 2 porties van 5 ml aceton (3.1) kwantitatief in de scheitrechter.

Sluit de scheitrechter af en schud het geheel gedurende 30 seconden.

Laat de fasen scheiden gedurende 10 minuten.

Laat de onderste zure waterige fase af in een bekersglas van 150 ml en spoel de scheitrechter na met 2 ml water (3.17).

Breng nu 10,0 ml zoutzuur 1 N in de indampkolf en zwenk enige malen (eventueel verwarmen op een kokend waterbad om alles van de wand los te krijgen).

Breng deze zure fraktie in de scheitrechter, sluit hem af en schud gedurende 30 seconden.

Laat nadat de fasen zijn gescheiden de zure fase af in het bekersglas en spoel de scheitrechter na met 2 ml water.

Breng nu 5,0 ml zoutzuur 1 N in de indampkolf, zwenk even en giet deze zuurfraktie in de scheitrechter.

Sluit de scheitrechter af en schud gedurende 30 seconden, laat de fasen scheiden en breng de onderstaande zuurfase in het bekersglas en spoel de scheitrechter na met 2 ml water.

Verwerp de hexaanfase en breng 40 ml verzadigde trinatriumcitraatoplossing (3.9) in de scheitrechter, sluit af en schud gedurende 10 seconden en laat dit af in het bekersglas.

Stel de pH van de oplossing in het bekersglas in (roervlo inbrengen) op 5,60 met behulp van natriumhydroxyde-oplossing 6 N (3.12) en maak hierbij gebruik van een digitale pH meter, spoel de elektrode, na indompeling, af met enige ml's water.

Breng de op pH 5,60 ingestelde oplossing kwantitatief in een scheitrechter van 250 ml met behulp van 30 ml dichloormethaan (3.3) en schud het geheel gedurende 30 seconden.

Laat de fasen scheiden en filtreer de onderstaande organische fase door een trechter waarin zich een propje watten bevindt met daar bovenop ca. 5 g natriumsulfaat (3.15).

Vang het filtraat op in een 100 ml erlenmeyer.

Spoel de scheitrechter na met 5 ml dichloormethaan.

Laat nu de waterige fase af in het bekersglas en controleer de pH op 5,60 en stel eventueel met natriumhydroxyde-oplossing 6 N bij.

Breng de waterige, op pH 5,60 ingestelde, oplossing met behulp van 15 ml dichloormethaan kwantitatief in de scheitrechter en sluit hem af.

Schud nu gedurende 30 seconden en laat de fasen scheiden.

Laat de organische fase af in de erlenmeyer via de trechter met natriumsulfaat en spoel de scheitrechter na met 5 ml dichloormethaan.

Controleer eventueel nogmaals de pH op 5.60.

Schud nu nog 2 keer met telkens 15 ml dichloormethaan en laat telkens de organische fase af via de trechter met natriumsulfaat.

Spoel de natriumsulfaatlaag met 2 porties van 5 ml dichloormethaan en damp in tot droog onder een stikstofstroom bij 30°-40°C en los het residu op in precies 2,0 ml oplosmiddel (3.22). Filtreer het geheel door een 0,45 µm milliporefilter en injecteer in het HPLC systeem.

6. Hogedrukvlloeistofchromatografie

Eluens : 12% acetonitril in bufferoplossing pH 7.7.

Injektievolumen: 50 µl.

Eluenssnelheid: 1,2 ml/min.

Golflengte : UV-254 nm.

Gevoeligheid : min 0,01 A.

Recorder : 10 mV.

Pap. snelheid : 10 mm/min.

Retentietijd : 8-10 min.

7. Uitvoering

Breng 50 µl van de verkregen monsteroplossing in het HPLC-systeem en vergelijk de sulfadimidinepiek met die, die met een van de standaardoplossingen (3.24.2) wordt verkregen.

Bereken het gehalte in mg/kg aan sulfadimidine in het monster.

8. Opmerkingen

8.1 Alle chemicaliën dienen voor analyse gecontroleerd te worden op bruikbaarheid.

8.2 Bij analyse van een vleessoort dient een "blanco" vlees geanalyseerd te worden ter vergelijking voor eventuele storingen etc.

8.3 Voor analyse van monsters welke meer dan 1 mg/kg aan sulfadimidine bevatten kan men de inweeg hoeveelheid met een faktor 10 verkleinen (dus 5 g monster).

8.4 De recovery (terugvindingspercentage) kan men bepalen door aan blanco vlees een zodanige hoeveelheid van de standaardoplossingen toe te voegen dat een gehalte van 100 ppb tot 1 ppm wordt verkregen.

8.5 Eluens HPLC.

Het eluens voldeed voor diverse vleessoorten. Het kan echter noodzakelijk zijn de samenstelling ervan dan aan te passen in verband met storingen.

De concentratie van acetonitril of de pH dient dan iets te worden gewijzigd voor optimale scheiding.

9. Literatuur

9.1 Manuel, A.J.; Steller, W.A.

Gas-Liquid Chromatographic. Determination of sulfamethazine in swine and cattle tissues.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. vol 64, no. 4, 1981.

9.2 Engel, W.H.B.; van Leusden, F.M.; Vaessen, H.A.M.G. en Van de Kamp, C.G.

Residuen van sulfonamiden in weefsel van mestvarkens aan welke via het voer sulfadioxine/trimethoprim werd verstrekt.

Intern rapport no. 147814001 RIV.

9.3 Bevill, R.F.; Schemske, K.M.; Luther, H.G.; Dzierzak, E.A.;
Limpoka, M. en Felt, D.R.

Determination of Sulfonamides in swine plasma.

J. Agric. Food Chem. vol. 26, no. 5, 1978.

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer



Samenstelling: W.M.J. Beek. *W.B.*

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. DGM 29

1e oplage (1983-02-10)

BEPALING VAN SULFADIMIDINE IN VLEES MET BEHULP VAN VLOEISTOFCHROMATO-
GRAFIE (HPLC-METHODE)

Verzendlijst: afd. Normalisatie/Harmonisatie, Bibliotheek (5x), sek-
torhoofd, afd. Diergeneesmiddelen (4x). *jm*

Bepaling van sulfadimidine in vlees met behulp van vloeistofchromatografie (HPLC-methode)

1. Doel en toepassingsgebied

Met de methode kunnen residuen in varkens-, runder- en kippevlees worden bepaald als ook in de levers en nieren hiervan. De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt ca. 10 ppb. Het toepassingsniveau van de methode ligt tussen 20 ppb - 1 ppm waarbij het terugvindingspercentage ca. 75% bedraagt.

2. Principe

Sulfadimidine wordt uit het materiaal geëxtraheerd met behulp van een chloroform/aceton mengsel.

Het extract wordt gezuiverd door vloeistof-vloeistof extractie.

Aansluitend wordt een zure oplossing op pH 5,60 gebracht waarna een vloeistof-vloeistof extractie met dichloormethaan volgt waarbij de sulfadimidine in de dichloormethaanfase overgaat.

Na verdampen van de dichloormethaanfase wordt sulfadimidine in het residu bepaald met behulp van isocratische "reversed phase" hogedruk-vloeistofchromatografie met UV-detektie bij 254 nm.

3. Reagentia

Alle reagentia dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn of van een hogere kwaliteit indien vermeld.

3.1 Aceton (b.v. Merck art. 14).

3.2 Chloroform (b.v. Merck art. 2445).

3.3 Dichloormethaan (b.v. Merck art. 6050).

3.4 Acetonitril (Lichrosorb kwaliteit, Merck art. 30).

3.5 Hexaan (b.v. Merck art. 4367).

3.6 Zoutzuur, gec. (b.v. Merck art 317).

3.7 Water, gedemineraliseerd.

3.8 Zoutzout 1 N.

Breng 8 ml zoutzuur (3.6) in water (3.7) en vul aan tot 100 ml.

3.9 Trinatriumcitraat 2 aq (b.v. Merck art. 6448).

3.10 Verzadigde trinatriumcitraatoplossing.

Meng meer dan 72 g trinatriumcitraat 2 aq (3.9) in 100 ml water (3.7).

3.11 Natriumhydroxyde (b.v. Merck art. 6498).

3.12 Natriumhydroxyde-oplossing 6 N.

Los 24 g natriumhydroxyde (3.11) op in 100 ml water (3.7).

3.13 Kaliumdiwaterstoffosfaat (b.v Merck art. 4873).

3.14 Kaliummonowaterstoffosfaat (b.v. Merck 5104).

3.15 Natriumsulfaat, watervrij (b.v. Merck art. 6649).

3.16 Stikstof, zuiver.

3.17 Millipore water.

3.18 o-fosforzuur (b.v. Merck art. 573).

3.19 1 Molair o-fosforzuuroplossing.

Breng 5,73 ml o-fosforzuur (3.18) in water (3.7) en vul aan tot 100 ml.

3.20 Extraktiemiddel: meng gelijke volumedelen chloroform (3.2) en aceton (3.1).

3.21 Glasvezelfilter GFA ϕ 15 cm (Whatman).

3.22 Milliporefilters (0,20 μ m) Acrodisc 4192.

3.23 HPLC eluens sulfadimidine.

12% oplossing van acetonitril (3.4) in bufferoplossing pH 7,7.

Los 6,89 g kaliumdiwaterstoffsfaat (3.13) en 8,79 g kaliummonowaterstoffsfaat (3.14) op in 1 l millipore water (3.17) en breng de pH met natriumhydroxyde-oplossing (3.12) op pH 7,70; gebruik een pH meter.

Voeg toe 136,4 ml acetonitril (3.4) en meng het geheel. Filtreer door een 0,45 μ m filter.

3.24 Sulfadimidine standaardstof.

3.24.1 Sulfadimidine stamoplossing (oplossing A).

Weeg 0,1 mg nauwkeurig ca 50 μ g standaardstof (3.24) af in een 100 ml maatkolf.

Los op in acetonitril (3.4) vul aan en meng.

3.24.2 Breng met een pipet 20,0 ml van de standaardoplossing in een 100 ml maatkolf en vul aan met HPLC eluens (3.23) en meng (oplossing B). Breng van deze oplossing met een pipet 10,0 ml in een maatkolf en vul aan met eluens en meng (oplossing C).

Breng respectievelijk met een pipet, 20,0 ml; 10,0 en 5,0 ml in afzonderlijke maatkolven van 50 ml, vul aan met eluens (oplossing D, E en F). De concentraties van de verkregen oplossingen zijn:

B 100 μ g/ml, C 10 μ g/ml, D 4 μ g/ml, E 2 μ g/ml, F 1 μ g/ml.

4. Apparatuur

4.1 Vleesmolen (b.v. Moulinette).

4.2 Ultra-Turrax met 18 N staaf.

4.3 Rotatieverdamer (bad temp. 30°-40°C).

4.4 Hogedrukvloeistofchromatografische apparatuur bestaande uit:
pomp, injector, UV-detektor, recorder, integrator.

4.5 HPLC-kolommen.

voorkolom : Bondapak C18/Corasil 37-50 micron

3,9 mm I.D. x 20 mm lengte

hoofdkolom: Lichrosorb RP 18 5 micron

4.6 mm I.D. x 15 cm lengte.

4.6 Digitale pH meter.

4.7 Normaal laboratoriumglaswerk.

5. Werkwijze

5.1 Extraktie.

Maal het materiaal goed fijn in een vleesmolen. Weeg hiervan 25,0 g af in een bekglas van 250 ml (50,0 g indien het monster minder dan 0,1 mg/kg aan sulfadimidine bevat).

Breng nu met een maatcilinder 100 ml extraktiemiddel (3.20) in het bekglas en macereer gedurende 1 minuut bij lage snelheid met een Ultra-Turrax en 2 minuten bij een hogere snelheid. Spoel hierna de Ultra-Turrax af met ca. 10 ml extraktiemiddel en filtreer de oplosmiddelfase nu voorzichtig over een glasvezelfilter (3.21) in een indampkolf van 500 ml zodanig dat het vlees achterblijft in het bekglas (gebruik een glazen roerstaaf).

Voeg hierna met een maatcilinder 50 ml extraktiemiddel in het bekglas en extraheer als bovenstaand.

Herhaal nadat ook deze extraktiefase is gefiltreerd het nogmaals met 50 ml extraktiemiddel en breng dan de inhoud van het bekglas nu geheel op het filter.

Spoel het filter etc. na met 25 ml extraktiemiddel.

(Indien er vezels etc. door het filter zijn gegaan, filtreer de gehele ekstraktoplossing nogmaals door een nieuw glasvezelfilter.)

Voeg nu aan de verzamelde extraktoplossing 10,0 ml zoutzuur 1 N (3.8) toe en damp de organische fase af op een rotatieverdamer totdat alle organische oplosmiddelen net zijn verdwenen (niet droogdampen).

5.2 Zuivering.

Breng het waterig residu met 75 ml hexaan (3.5) in een scheitrechter van 250 ml.

Breng 10,0 ml zoutzuur 1 N (3.8) in de indampkolf en zwenk de kolf enige malen en breng dit in de scheitrechter met 75 ml hexaan.

Spoel het resterende residu nu met 2 porties van 5 ml aceton (3.1) kwantitatief in de scheitrechter.

Sluit de scheitrechter af en schud het geheel gedurende 30 seconden.

Laat de fasen minstens 10 minuten scheiden.

Laat de onderste zure waterige fase af in een bekersglas van 150 ml en spoel de scheitrechter na met 2 ml water (3.7).

Breng nu 10,0 ml zoutzuur 1 N in de indampkolf en zwenk enige malen (eventueel verwarmen op een kokend waterbad om alles van de wand los te krijgen).

Breng deze zure fraktie in de scheitrechter, sluit hem af en schud het geheel 30 seconden.

Laat nadat de fasen 5 minuten zijn gescheiden de zure fase af in het bekersglas en spoel de scheitrechter na met 2 ml water.

Breng nu 5,0 ml zoutzuur 1 N in de indampkolf, zwenk even en giet deze zuurfraktie in de scheitrechter.

Sluit de scheitrechter af en schud gedurende 30 seconden, laat de fasen scheiden en breng de onderstaande zuurfase in het bekersglas en spoel de scheitrechter na met 2 ml water.

Verwerp nu de hexaanfase en breng de verzamelde zuurfasen met behulp van 10 ml chloroform (3.2) in de scheitrechter.

Sluit de scheitrechter af en schud voorzichtig gedurende 30 seconden.

Laat de fasen minstens 10 minuten scheiden en verwerp de onderstaande chloroformfase.

Breng nu 10 ml chloroform in het bekersglas, zwenk enige malen en giet het geheel in de scheitrechter.

Sluit de scheitrechter af en schud gedurende 30 seconden. Laat het geheel minstens 5 minuten scheiden en verwerp de onderstaande chloroformfase. Breng nu 5 ml chloroform in het bekersglas, zwenk even en giet dit in de scheitrechter.

Sluit de scheitrechter af en schud 30 seconden. Laat de fasen minstens 5 minuten scheiden en verwerp dan de onderstaande chloroformfase.

Laat de zuurfase nu af in het bekerglas en spoel de scheitrechter na met 2 ml water.

Breng 40 ml verzadigde trinatriumcitraatoplossing (3.10) in de scheitrechter, sluit af en schud gedurende 10 seconden en laat dit eveneens af in het bekerglas. Stel de pH van de oplossing in het bekerglas in (roervlo inbrengen) op 5,60 met behulp van natriumhydroxide-oplossing 6 N (3.12) en maak hierbij gebruik van een digitale pH meter en spoel de elektrode, na indompeling, af met enige ml's water.

Breng de op pH 5,60 ingestelde oplossing kwantitatief in de scheitrechter van 250 ml met behulp van 30 ml dichloormethaan (3.3) en schud het geheel gedurende 30 seconden.

Laat de fasen minstens 10 minuten scheiden en filtreer de onderstaande organische fase door een trechter waarin zich een propje watten bevindt met daar bovenop ca. 5 g natriumsulfaat (3.15).

Vang het filtraat op in een 100 ml erlenmeyer.

Spoel de scheitrechter na met 5 ml dichloormethaan.

Laat nu de waterige fase af in het bekerglas en controleer de pH op 5,60 en stel eventueel bij met natriumhydroxyde-oplossing 6 N of o-fosforzuur 1 M.

Breng de waterige, op pH 5,60 ingestelde, oplossing met behulp van 15 ml dichloormethaan kwantitatief in de scheitrechter en sluit hem af.

Schud nu gedurende 30 seconden en laat de fasen minstens 5 minuten scheiden.

Laat de organische fase af in de erlenmeyer via de trechter met natriumsulfaat en spoel de scheitrechter na met 5 ml dichloormethaan.

Controleer de pH nogmaals op 5.60.

Breng de waterige fase in de scheitrechter en schud nu nog 2 keer met telkens 15 ml dichloormethaan en laat steeds de organische fase af via de trechter met natriumsulfaat.

Spoel de natriumsulfaatlaag met 2 porties van 5 ml dichloormethaan en damp in tot droog onder een stikstofstroom bij 30°-40°C en los het residu op in precies 2,0 ml HPLC eluens (3.23) (laat minstens 10 minuten staan en zwenk daarna even). Filtreer het geheel door een 0,2 µm milliporefilter en injecteer in het HPLC systeem.

6. Hogedrukvlloeistofchromatografie

Kolom : Lichrosorb 5 RP 18 (4,6 mm ID x 15 cm lengte).

Eluens : 12% acetonitril in bufferoplossing pH 7.70.

Eluenssnelheid: 1,2 ml/min.

Detectiegolf-

lengte : UV 254 nm.

Injektievolume: 50 µl.

Retentietijd : > 6 min.

7. Uitvoering

Breng 50 µl van de verkregen monsteroplossing in het HPLC-systeem en vergelijk de sulfadimidinepiek met die, die met een van de standaardoplossingen (3.24.2) wordt verkregen.

Bereken het gehalte in mg/kg aan sulfadimidine in het monster.

8. Opmerkingen

8.1 Alle chemicaliën dienen voor analyse gecontroleerd te worden op bruikbaarheid.

8.2 Bij analyse van materiaal dient "blanco" materiaal geanalyseerd te worden ter vergelijking voor eventuele storingen etc.

8.3 Het gebruik van een Omni-mixer met vrijstaande rotoras en 1 inch-mes als extraktor, dient toegepast te worden indien het materiaal niet fijn genoeg is om behandeld te worden met een Ultra-Turrax.

8.4 De recovery (terugvindingspercentage) kan men bepalen door aan blanco materiaal een zodanige hoeveelheid van de standaardoplossingen toe te voegen dat een gehalte van 100 ppb tot 1 ppm wordt verkregen.

8.5 Eluens HPLC.

Het eluens voldeed voor diverse vleessoorten. Het kan echter noodzakelijk zijn de samenstelling ervan aan te passen in verband met storingen.

De concentratie van acetonitril of de pH dient dan iets te worden gewijzigd voor optimale scheiding.

8.6 Kolom HPLC

Men kan ook gebruik maken van een μ Bondapak C18 kolom (3,9 mm ID x 30 cm lengte, 10 micron) van Waters met dezelfde analyseomstandigheden als bij Lichrosorb RP 18.

9. Literatuur

9.1 Manuel, A.J.; Steller, W.A.

Gas-Liquid Chromatographie. Determination of sulfamezathine in swine and cattle tissues.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. vol 64, no. 4, 1981.

9.2 Engel, W.H.B.; van Leusden, F.M.; Vaessen, H.A.M.G. en Van de Kamp, C.G.

Residuen van sulfonamiden in weefsel van mestvarkens aan welke via het voer sulfadioxine/trimethoprim werd verstrekt.

Intern rapport no. 14781400 RIV.

9.3 Bevill, R.F.; Schemske, K.M.; Luther, H.G.; Dzierzak, E.A.; Limpoka, M. en Felt, D.R.

Determination of Sulfonamides in swine plasma.

J. Agric. Food Chem. vol. 26, no. 5, 1978.

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer

Samenstelling: W.M.J. Beek. W.B.

Bloed

K = controlegroep
S = behandelde groep

- = niet onderzocht

Dag	nummer	gevonden ppm	Recovery
een	K1	1,26	99,1%
	K2	1,65	
	S1	86,8/92,7	
	S2	140,8	
twee	K3	1,94	106%
	K4	1,94	104%
	S3	1,68	
	S4	1,53	
drie	K5	1,40	121%
	K6	1,46	99,1%
	S5	1,41	
	S6	1,25	
vier	K7	1,20	121%
	K8	1,31	99,1%
	S7	1,97	
	S8	1,52	
vijf	K9	0,7	121%
	K10	2,06	99,1%
	S9	1,34	
	S10	1,43	
acht	K11	1,2	121%
	K12	2,3	99,1%
	S11	1,36	
	S12	1,44	
elf	K13	afwezig	99,1%
	K14	-	
	S13	afwezig	
	S14	afwezig	

Plasma

K = controlegroep

- = niet onderzocht

S = behandelde groep

Dag	nummer	gevonden ppm	Recovery
een	K1	2,04	120%
	K2	2,04	
	S1	98,2/79,7	
	S2	154,15	
twee	K3	1,68	104% 120%
	K4	1,52	
	S3	1,88	
	S4	1,80	
drie	K5	1,10	121% 99,1%
	K6	1,17	
	S5	1,84	
	S6	2,22	
vier	K7	1,20	121% 99,1%
	K8	1,27	
	S7	2,49	
	S8	2,66	
vijf	K9	0,9	121% 99,1%
	K10	0,96	
	S9	2,86	
	S10	3,11	
acht	K11	0,9	121% 99,1%
	K12	1,11	
	S11	3,07	
	S12	2,90	
elf	K13	afwezig	121%
	K14	-	
	S13	afwezig	
	S14	afwezig	

Vlees

K = kontrolegroep
S = behandelde groep

- = niet onderzocht

Dag	nummer	gevonden ppm	Recovery
een	K1	niet aant.b.	
	K2	-	
	S1	43 ppm	38%
	S2	75-77 ppm	38%/111%
twee	K3	37 ppb	
	K4	-	
	S3	49 ppb	89%
	S4	38 ppb	38%
drie	K5	13,2 ppb	21%?
	K6	-	
	S5	26 ppb	89%
	S6	17 ppb	89%
vier	K7	19 ppb	
	K8	-	
	S7	22,5 ppb	21%
	S8	25 ppb	38%
vijf	K9	-	
	K10	-	
	S9	8,5 ppb	21%
	S10	72 ppb	111%
acht	K11	-	
	K12	-	
	S11	8,0 ppb	21%
	S12	45 ppb	111%
elf	K13	-	
	K14	-	
	S13	7,7 ppb	21%
	S14	26 ppb	111%

Lever

K = controlegroep

- = niet onderzocht

S = behandelde groep

Dag	nummer	gevonden ppm	Recovery
een	K1	0,04 ppm	84%
	K2	-	
	S1	46,27 ppm	84%
	S2	62,4 ppm	225%
twee	K3	0,01 ppm	225%
	K4	-	
	S3	0,30 ppm	84%
	S4	0,35 ppm	225%
drie	K5	afwezig	36%
	K6	-	
	S5	0,12 ppm	84%
	S6	0,10 ppm	84%
vier	K7	niet aant.b.	47%
	K8	-	
	S7	0,06 ppm/afw	47/36%
	S8	0,03 ppm	225%
vijf	K9	-	
	K10	-	
	S9	0,04/afwezig	47/36%
	S10	0,05	225%
acht	K11	-	
	K12	-	
	S11	afwezig	36%
	S12	0,01 ppm	47%
elf	K13	-	
	K14	-	
	S13	0,08 ppm	36%
	S14	0,03 ppm	47%

Nier

K = kontrolegroep
S = behandelde groep

- = niet onderzocht

Dag	nummer	gevonden ppm	Recovery
een	K1	0,01 ppm	22%
	K2		
	S1	79,1 ppm	22%
	S2	156 ppm	71%
twee	K3	10 ppb	71%
	K4		
	S3	0,58 ppm	22%
	S4	2,91 ppm	71%
drie	K5	33 ppb	77%
	K6	-	
	S5	0,31	22%
	S6	0,17	22%
vier	K7		
	K8		
	S7	72 ppb	77%
	S8	100 ppb	71%
vijf	K9		
	K10		
	S9	84 ppb	71%
	S10	60 ppb	77%
acht	K11		
	K12		
	S11	55 ppb	77%
	S12	80 ppb	71%
elf	K13		
	K14		
	S13	131 ppb	77%
	S14	190 ppb	71%